

MARIA EUGÊNIA RABELLO DUARTE

LECTINAS DE MASSAS DE OVAS DE
MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria*

TESE DE MESTRADO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMI-
CA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO PARANÁ

CURITIBA, 1980

Tese orientada pelo
Prof. JOSÉ HAZENCLEVE DUARTE

Aos meus pais e irmãos.

AÇRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. JOSÉ HAZENCLEVE DUARTE, pela orientação necessária à realização do presente trabalho.

- Aos Drs. EURÍPEDES FERREIRA e MARIA DAS GRAÇAS CANTO pelo fornecimento do sangue utilizado nos testes imunológicos.

- A Profa. HELENA SIMÕES DUARTE pelo envio dos planorbídeos *B. straminea*.

- Ao Prof. ENIO LUZ, pelo envio dos planorbídeos *B. glabrata*.

- Ao Prof. Dr. AGUINALDO JOSÉ DO NASCIMENTO e Prof. MARIO STENCEL pela orientação e sugestões na realização das técnicas de eletroforese.

- A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Profa. Dra. GLACI TEREZINHA ZANCAN.

- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida para a realização do presente trabalho.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Projeto nº 5218 e 7495/75-SIP-106 e FINEP 380/CT.

- Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

- Ao Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR ,
pela colaboração na impressão desta tese.

- A MARIA DA GRAÇA ZANETTI, pela dedicação na exe
cução dos trabalhos de datilografia.

SUMÁRIO

RESUMO	09
INTRODUÇÃO	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
1.0 - Métodos Gerais	18
2.0 - Obtenção do Extrato Bruto de Massas de <u>B.straminea</u> ...	20
2.1 - Fracionamento do extrato bruto de massas de ovas de <u>B. straminea</u> com sulfato de amônia	20
2.2 - Purificação da fração FMO-S por cromatografia de afinidade	21
2.3 - Preparação do extrato bruto de massas de ovas de <u>B. glabrata</u>	22
2.4 - Fracionamento do extrato bruto de massas de ovas de <u>B. glabrata</u> com sulfato de amônia	23
2.5 - Preparação do extrato bruto de massas de ovas de <u>B. tenagophila</u>	23
2.6 - Preparação do extrato bruto de glândula de albú- men de <u>B. straminea</u>	23
2.7 - Fracionamento do extrato bruto de glândula de al- búmen de <u>B. straminea</u> com sulfato de amônia	24
2.8 - Preparação do extrato bruto de glândula de albú- men de <u>B. tenagophila</u>	24
2.9 - Fracionamento do extrato bruto de glândula de al- búmen de <u>B. tenagophila</u> com sulfato de amônia...	25
2.10- Preparação do extrato bruto de glândula de albú- men de <u>B. glabrata</u>	25
2.11- Fracionamento do extrato bruto de glândula de al- búmen de <u>B. glabrata</u> com sulfato de amônia	25
3.0 - Métodos Imunológicos	26
3.1 - Reação de hemoaglutinação com hemácias humanos..	26
3.2 - Reação de hemoaglutinação com hemácias de coelho e de embrião de galinha	27
3.3 - Inibição da reação de hemoaglutinação por açúcares	27
3.4 - Efeito de cátions divalentes sobre a reação de hemoaglutinação	26
3.5 - Efeito do íon Mg^{++} sobre ação dos açúcares in- bibidores da reação de hemoaglutinação.....	28

TABELA XI - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação de lectina de MO de <u>B. glabrata</u>	45
TABELA XII - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação da lectina de MO de <u>B. glabrata</u>	45
TABELA XIII - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação da lectina de GA de <u>B. tenagophila</u>	46
TABELA XIV - Título de hemoaglutinação da fração FGA-S da GA de <u>B. straminea</u> , em função do tempo	47
TABELA XV - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre o título de hemoaglutinação da fração FGA-S de GA de <u>B. straminea</u> , em função do tempo.....	48
TABELA XVI - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FMO-S de MO de <u>B. straminea</u>	49
TABELA XVII - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FMO-S de MO de <u>B. glabrata</u>	50
TABELA XVIII - Inibição da reação de hemoaglutinação do EB DE MO de <u>B. tenagophila</u>	51
TABELA XIX - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FGA-S da glândula de albúmen de <u>B. straminea</u>	52
TABELA XX - Inibição da reação de hemoaglutinação de FGA-F de GA de <u>B. glabrata</u>	53
TABELA XXI - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FGA-T da GA de <u>B. tenagophila</u>	54
TABELA XXII - Purificação da lectina de MO de <u>B. straminea</u> ..	55
TABELA XXIII - Título de hemoaglutinação da fração FMO-S-P- de MO de <u>B. straminea</u>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Cromatografia da fração FMO-S em coluna Sephadex G-75-120 (2,5 x 25.0 cm)	57
FIGURA 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FMO-S-P	58
FIGURA 3 - Eletrofocalização em gel de poliacrilamida da fração FMO-S-P	59

3.6 - Diálise do EB de MO de <u>B. straminea</u> contra ácido acético	28
3.7 - Efeito de EDTA sobre a reação de hemoaglutinação...	30
3.8 - Efeito do soro anti-a e anti-B na reação de inibição da hemoaglutinação por carboidratos.....	31
3.9 - Reação de hemoaglutinação em presença de soro anti-B e de D-galactose	31
3.10- Remoção do EDTA, do EB de massas de ovas de <u>B. straminea</u> , por diálise	32
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I - Concentração de carboidratos (μ Moles) utilizados na reação de inibição da hemoaglutinação, na presença de íons Mg^{++}	29
TABELA II - Hemoaglutinação de lectina de EB de <u>B. straminea</u> , <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u>	36
TABELA III - Títulos de hemoaglutinação de EB de <u>B. straminea</u> , <u>B. glabrata</u> e <u>B. tenagophila</u>	37
TABELA IV - Fracionamento do EB de MO de <u>B. straminea</u> por sulfato de amônia	38
TABELA V - Fracionamento do EB de MO de <u>B. glabrata</u> por sulfato de amônia	39
TABELA VI - Fracionamento do EB de GA de <u>B. straminea</u> por sulfato de amônia	40
TABELA VII - Fracionamento do EB de GA de <u>B. glabrata</u> por sulfato de amônia	41
TABELA VIII - Fracionamento do EB de GA de <u>B. tenagophila</u> por sulfato de amônia	42
TABELA IX - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação de lectina de MO de <u>B. straminea</u> ...	43
TABELA X - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação de GA de <u>B. straminea</u>	44

RESUMO

Lectinas que aglutinam especificamente eritrócitos humanos do tipo A (lectina anti-[A]), foram isoladas de massas de ovas (MO) de *B. straminea*, *B. tenagophila* bem como de glândula de albúmen (GA) de *B. straminea*. Entretanto a lectina de MO de *B. glabrata* diferencia-se das de *B. straminea* e *B. tenagophila* por apresentar atividade hemoaglutinante com hemácias A, B, e AB (lectina do tipo anti-[A+B]).

As lectinas dos moluscos estudados não apresentaram atividade hemoaglutinante com hemácias de coelho ou de embrião de galinha.

Após saturação com sulfato de amônia (0-40 e de 40-75% de saturação) a lectina de MO de *B. straminea* foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 120. A proteína purificada por este método, representa 9% das proteínas totais solúveis, em solução de cloreto de sódio 0,9%.

Esta fração purificada é homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 4,5. Eletrofocalização desta glicoproteína apresentou uma única faixa de proteína, correspondente a pH 7,6.

A quantidade mínima de proteína purificada, necessária para provocar aglutinação máxima (++++), com hemácias do tipo A, foi de 77 ng.

As reações de hemoaglutinação das lectinas de MO

de *B. straminea*, *B. glabrata* e de GA de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram fortemente estimuladas por iontes de Mg^{++} . Iontes Ca^{++} , Co^{++} e Mn^{++} não apresentavam efeito estimulador sobre a reação de hemoaglutinação das lectinas dos moluscos estudados.

Estudos sobre a interação lectina - carboidrato , demonstraram que ceto-hexoses, (D-frutose , L-sorbose e D-tagatose) são os inibidores genéricos destas lectinas.

INTRODUÇÃO

DIXSON ¹⁵, 1887 descobriu que extratos de *Ricinus communis* continha proteínas com uma notável capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas foram denominadas inicialmente de aglutininas, fitohemoaglutininas, e, mais recentemente por BOYD & SHAPLEIGH ¹⁰ de lectinas (legere = selecionar) baseados na observação de que muitos extratos de sementes podem distinguir grupos ^{9,10} e até mesmo sub-grupos do sistema sanguíneo ABO.

Em 1949, BOYD & REGUERA ⁹ descobriram que extratos de *Phaseolus lunatus* aglutinava seletivamente eritrócitos humanos do tipo A. RENKONEN ⁶⁴ simultaneamente faz a mesma observação, relatando a presença de lectinas específicas para grupos sanguíneos.

Esta descoberta renovou o interesse pelo isolamento e caracterização de lectinas e marcou o início dos estudos das aplicações destas fascinantes proteínas nos estudos biológicos. Com o desenvolvimento das investigações sobre lectinas verificou-se que essas hemoaglutininas são encontradas não só em plantas ⁵¹ como também em bactérias ²⁵, fungos ^{20,21,69}, líquens ^{18,36}, peixes ^{57,78,81}, esponjas ^{43,44}, carangueijos ^{52,68,81}, estrela do mar ⁸⁵, caramujos ^{8,12,24,32,54,60,61,63,70,81,83} e até mesmo em mamíferos ^{14,38,67,74}.

Uma interessante atividade biológica de inúmeras lectinas, foi primeiramente descoberta em extratos de semen-

tes de *Phaseolus vulgaris*^{47,55}. Esta lectina (comumente denominada de PHA) tem a capacidade de estimular a transformação morfológica de linfócitos. Esta transformação é acompanhada por extensivas mudanças biológicas, sendo a mais surpreendente o aumento da síntese de DNA e RNA, culminando finalmente na divisão da célula. RIGAS & HEAD⁶⁶ demonstraram por eletroforese em gel de poliacrilamida de *P. vulgaris* em tampão borato-urea pH 8,7 a presença de 8 bandas de glicoproteínas, as quais variavam entre si quanto a razão de atividade mitogênica e eritroaglutinante, sugerindo assim uma combinação em várias razões^{65,66} das subunidades eritro-aglutinante e mitogênica. Como sugerido por LIS & SHAROM⁴⁷ a função das lectinas mitogênicas pode estar relacionado com o controle da divisão e germinação celular.

Concanavalina A (Con A)^{1,2,3,4,5} é sem dúvida a mais notável aglutinina de origem vegetal sendo uma das poucas lectinas desprovidas de carboidratos ligados covalentemente⁷⁷. Neste aspecto assemelham-se a aglutinina do germe do trigo²⁶ e aparentemente a de *Pisum sativum*^{6,17}. Con. A foi primeiramente isolada e cristalizada por SUMNER & HOWEL^{75,76,77}. Conhecendo a propriedade de que Con. A precipita dextranos^{27,29,35} AGRAWAL & GOLDSTEIN^{2,3} em 1965 purificaram esta lectina por adsorção em gel de dextrano (Sephadex) e posterior eluição com o inibidor competitivo desta interação^{28,29}, (D-glucose). Este foi o primeiro relato da purificação de lectinas usando-se cromatografia de afinidade.

Ultracentrifugação demonstrou que Con. A é monodispersa a pH 2,5 enquanto que, a pH 7,0 existem dois picos, o que sugere uma associação de subunidade dependentes do pH^{1,4,56}. Abaixo de pH 5,6 há formação de dímeros de P.M. 52000 e acima de pH 5,6 forma-se tetrameros de P.M. 104000. Este dado está plenamente de acordo com o obtido por análise de aminoácidos e é muito semelhante com o valor obtido inicialmente por SUMMER, P.M. 96000 a pH 7,0.

Tratamento da Con. A com tripsina produz uma forma monomérica que restaura o crescimento normal de células tumorais (3T3)¹¹. A capacidade dessas proteínas formarem dímeros ou tetrâmeros explica muitas das propriedades biológicas^{49,50} das lectinas. Deste modo a lectina de *Phaseolus lunatus*²³, na forma tetrâmérica possui atividade mitogênica e eritroaglutinante muito mais potente do que sua forma dimérica.

Análise de metais por absorção atômica e espectroscopia de emissão de chama demonstrou que inúmeras lectinas são metaloproteínas. Iontes divalentes tais como manganês, magnésio e cálcio são comumente associados a lectinas. Uma poderosa lectina anti-A₁, isolada de sementes de *Dolichos biflorus*⁴⁵ é uma metaloproteína que contém cálcio, magnésio e zinco. A reação de hemoaglutinação desta lectina foi fortemente estimulada por cálcio, cobalto e níquel, embora o ionte manganês não tenha apresentado efeito estimulador. KOCOUREK et al. sugeriram⁴⁵ que o sítio ligante para o manganês na lectina

permanece ocupado por este metal, enquanto que os outros metais são removidos dos seus sítios durante o processo de isolamento da lectina. Estes autores sugerem ainda que o efeito estimulador de muitos cations divalentes sobre a atividade de lectinas pode ser devida a sua interação com a membrana da superfície do eritrócito, como por exemplo com resíduos de ácido siálico, o qual resultaria numa diminuição da carga negativa da superfície do eritrócito e um possível aumento da aglutinação. A remoção de iões metálicos de lectinas ocasiona sua inatividade, como é o caso da lectina isolada de sementes de *Bandeiraea simplicifolia*³⁴. Após exaustiva diálise contra ácido acético, esta lectina apresentou-se inativa para precipitar guaran. Titulação dessa lectina, livre de metal, contra concentrações crescentes de cálcio e manganês, até uma concentração final de 5 mM restaurou 99% da atividade com iões cálcio e 79%, com o ião manganês. SUMMER & HOWEL⁷⁶ em 1936 observaram que iões cálcio e manganês são necessários para todas^{5,42,76,88} as atividades biológicas da Con. A. Cada uma das quatro subunidades da Con. A contém tres sítios ligantes, um para cálcio outro para manganês⁷¹ e um terceiro sítio para carboidrato⁷².

Purificação da Con. A por cromatografia de afinidade em Sephadex pode originar uma forma parcialmente desmetalizada, a qual difere em sua habilidade ligante a carboidratos^{41,82}. Esta diferença pode ser evitada pela adição de cálcio e manga

nês ao meio de reação.

Estudos sobre a complementaridade da interação carboidrato-lectina tem sido feitos pela comparação da mínima concentração de açúcar requerida para inibir ou a reação de precipitação da lectina com a macromolécula reativa ou a reação de hemoaglutinação^{7,13,27,29,32,33,53,77,86}.

Em 1899, CAMUS¹² relatou pela primeira vez atividade aglutinante em extratos de glândula de albúmen de *Helix pomatia* (phylum Molusca, classe gastropoda) contra hemácias de diferentes espécies animais incluindo o homem. Posteriormente vários investigadores^{20-32,39, 61-62, 83} demonstraram que esta atividade hemoaglutinante era específica para eritrócitos do tipo A. Esta lectina é também encontrada nas massas de ovos⁸⁴. A glândula de albúmen possui relativamente grande quantidade de lectina (aproximadamente 8% do total de proteínas no sobrenadante obtido após extração com tampão fosfato salino e ultracentrifugação)³¹. Esta lectina foi facilmente purificada por imunoadsorção em substância³⁰⁻³² insolúvel do grupo sanguíneo A humano ou de porco. Cerca de 85% da lectina adsorvida foi recuperada após eluição com N-acetil-D-galactosamina³¹ 0,005 M. Purificação desta lectina também pode ser feita por adsorção em Sephadex G-200³¹ e posterior eluição com N-acetil-D-galactosamina. Esta hemoaglutinina embora fosse homogênea em Biogel P-150 e P-300³¹ e por ultracentrifugação^{30,31,32,40} apresentou entretanto certo grau de heterogeneidade em eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 8,6. Estudos sobre a inibição da precipitação desta lectina com a substância

do grupo sanguíneo A demonstrou que Me- α -D-Gal é o melhor inibidor desta reação de precipitação.

Atividade lectínica em glândula de albúmen de *B. glabrata* e *B. tenagophila* foi primeiramente investigada por SAMPAIO et al.⁷⁰. Extrato da glândula de albúmen de *B. glabrata*⁷⁰ contém uma poderosa lectina do tipo anti-(A+B) a qual foi purificada por tratamento com sulfato de amônio (30-60% de saturação) e posterior cromatografia em Sephadex G-50 e DEAE-Sephadex A-50. Esta fração altamente purificada foi homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida e em eletroforese em papel acetilado. A atividade hemoaglutinante desta glicoproteína foi inibida por D-glucosamina (37,5 μ moles) e D-galactosamina (92,5 μ moles).

Extrato bruto de glândula de albúmen de *B. tenagophila*⁷⁰ possui uma aglutinina específica para eritrócitos humanos do tipo A e esta reação foi inibida por D-galactose (50 μ moles) e N-acetil-D-glucosamina (50 μ moles).

As lectinas de moluscos do gênero *Biomphalaria* se ligam a açúcares localizados na superfície das hemácias A e B, os quais diferem dos açúcares imunodeterminantes dos grupos sanguíneos A ou B.

MELO & PARAENSE⁵⁴, observaram que a atividade lectínica da glândula de albúmen de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, para o sistema ABO, variava com a distribuição geográfica dos moluscos.

A atividade lectínica em massas de ovas de molus-

co (*H. pomatia*) foi inicialmente investigada por HULENBRUCK et al.⁸⁴.

Até o presente nenhuma investigação foi realizada sobre a atividade lectínica de massas de ovas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. A finalidade desta investigação é verificar se a atividade lectínica de massas de ovas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* apresentam as mesmas propriedades hemoaglutinantes assinaladas por outros investigadores na glândula de albúmen destes moluscos.

Na presente investigação também foi incluído um estudo sobre a lectina da glândula de albúmen de *B. straminea* a qual não fora investigada anteriormente.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.0 - MÉTODOS GERAIS

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi efetuada empregando-se tampão β -alanina ácido-acético 0,025 M pH 4,5 segundo a técnica de GABRIEL ²². O gel de poliacrilamida foi usado em concentração de 7,5% e preparado do seguinte modo:

a) Acrilamida a 30%

7,5 g acrilamida

0,2 g bisacrilamida

água q.s.p. 25,0 ml

b) KOH N 12,0 ml.

Ácido acético 4,3 ml

TEMED 1.0 ml

água q.s.p. 25,0 ml

c) Persulfato de amônio 0,07 g

água q.s.p. 25,0 ml

d) Poliacrilamida*7,5%

2 partes de a)

1 parte de b)

4 partes de c)

1 parte de água

A mistura d) foi colocada em tubos (0,6 x 9,0 cm) e deixada em repouso por 3 horas a fim de se obter completa polimerização.

Em seguida a amostra de proteína (40 µg de FMO-S-P) foi aplicada a coluna de gel e submetida a voltagem de 350 V e a amperagem de 3mA por tubo (D.C. Power Supply, modelo 3371E, LKB Bromma), durante duas horas. A coloração da proteína foi efetuada com solução de "comassie brilliant blue" (1 g de corante em 100 ml de ácido tricloroacético 12,5%) durante 12 horas, à temperatura ambiente. A descoloração foi realizada com ácido tricloroacético 12,5%, durante 12 horas.

Eletrofocalização em gel de poliacrilamida foi efetuada segundo a técnica de WRIGLEY⁸⁷, empregando-se "Ampholine", LKB Aminkemi de pH 3-10.

A concentração total em carboidratos da amostra analisada foi determinada pelo método do fenol-ácido-sulfúrico¹⁶, tomando-se como padrão uma solução de D-galactose.

Proteínas foram dosadas pelo método de LOWRY et al.⁴⁸ utilizando-se como padrão uma solução de albumina bovina (Armour) contendo 200 µg por ml. As leituras espectrofotométricas foram efetuadas em espectrofotometro Beckman DU.

As substâncias químicas utilizadas no presente trabalho foram das seguintes procedências: carboidratos, da Pfans tiehl Chemical Co. e da Sigma Chemical Co.; acrilamida, bisacrilamida e "TEMED" (N,N,N',N'-tetrametilenodiamino), da Eastman Organic Chemical Co.; "Sephadex" G-75 da AB Pharmacia, Uppsala; "Tris" (Tris (hidroximetil) aminometano), da Sigma Chemical Co.; "Ampholine" pH 3-10, da LKB Aminkemi; "EDTA" (etileno-diaminotetraacetato, na forma de sódio, $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2$ -

2H₂O), da Fischer Scientific Co., "Comassie brilliant blue" , da Searle, Diagnostic High Wycombi Bucks, England. Demais reagentes químicos foram de procedencia da E. Merck AG-Darmstadt.

2.0 - OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE MASSAS DE OVAS DE *B. straminea*.

Os exemplares de *B. straminea* utilizados no presente trabalho foram coletados em Recife, Pernambuco, Brasil.

Massas de ovas (MO) de zero dia foram recolhidas em solução de cloreto de sódio 0,9% e conservadas a 0-2°C.

As massas de ovas (2000 MO por 30 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%) foram em seguida trituradas em aparelho de Van Potter-Elvehjem e centrifugadas (8000 g, 0-2°C durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada modelo RC2-B, da Sorvall Inc. O resíduo desta centrifugação foi re-extraído com cloreto de sódio 0,9% (5,0 ml) e centrifugado. Os sobrenadantes foram reunidos, (324,6 mg de proteína por 35 ml) e considerados como sendo o extrato bruto (EB).

2.1. Fracionamento do extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea* com sulfato de amônia.

O extrato bruto de *B. straminea* (296,7 mg de proteína em 32 ml) foi inicialmente fracionado com sulfato de amônia (40% de saturação, 7,75 g); pelo uso da seguinte equação a concentração de sulfato de amônia foi calculada: 46

$$X = \frac{53,3 (S_2 - S_1)}{1 - (0,3 \times S_2)}$$

X = g de sulfato de amônia por 100 ml de uma solução de saturação S_1 para elevá-la à saturação S_2 , sendo S_1 e S_2 expressos em frações de saturação a 23°C.

Após repouso de 24 horas à temperatura de 2-4°C o EB saturado a 40% foi centrifugado (25000 g a 0-2°C, durante 30 minutos). O precipitado, após diálise contra uma solução de cloreto de sódio 0,9%, foi desprezado por apresentar pequena atividade hemoaglutinante. Em seguida o sobrenadante foi elevado à saturação de 75% com sulfato de amônia (7,7 g) e deixado em repouso por 24 horas à temperatura de 2-4°C. Após centrifugação (25000 g a 0-2°C, durante 30 minutos) o precipitado foi solubilizado em cloreto de sódio 0,9% e dializado exaustivamente contra esta mesma solução, até apresentar teste negativo com o reagente de Nessler, a 4°C. O material não dialisável foi centrifugado (25000 g, a 0-2°C, durante 30 minutos) sendo o precipitado desta centrifugação desprezado por não apresentar atividade hemoaglutinante. Esta fração recebeu o nome de FMO-S (10 ml contendo 51,5 mg de proteína).

O sobrenadante da saturação de 75% com sulfato de amônia foi desprezado.

2.2. Purificação da fração FMO-S por cromatografia de afinidade.

Uma amostra da fração FMO-S (15,5 mg de proteína) foi aplicada a uma coluna (2,5 x 25 cm) de Sephadex G-75-120, a qual fora tratada previamente com uma solução de cloreto de sódio 152 mM

contendo cloreto de magnésio numa concentração 10 mM (3000 ml). O material da coluna foi primeiramente eluido com a solução salina a qual foi desprezada por não apresentar atividade hemoaglutinante. A seguir o material da coluna foi eluido com solução salina contendo D-frutose (cloreto de sódio 152 mM, cloreto de magnésio 10 mM e D-frutose 0,2 M). O fluxo de escoamento do líquido eluente foi de 3-5 ml por hora. Frações de 3,0 ml foram coletadas (coletor de frações Büchler, Instruments Inc.) à temperatura de 2-4°C (câmara fria). Frações eluídas com solução salina contendo D-frutose foram dializadas contra cloreto de sódio 0,9% contendo 10 mM de cloreto de magnésio, à temperatura de 4°C. Em cada fração do eluato foram testados atividade hemoaglutinante e teor de proteína. As frações que apresentavam atividade hemoaglutinante foram reunidas e liofilizadas. Esta fração, contendo 8,7 mg de proteína, recebeu o nome de fração purificada (FMO-S-P).

2.3. Preparação do extrato bruto de massas de ovas de *B. glabrata*.

Massas de ovas (MO) de *B. glabrata* (moluscos provenientes de Jacarezinho, Paraná, Brasil) foram coletadas em solução de cloreto de sódio 0,9% e conservadas 0-2°C. Após trituração em aparelho de Van-Potter-Elvehjem, o homogenado de ovas foi centrifugado (8000 g 0-2°C durante 30 minutos em centrífuga refrigerada modelo RC2-B da Sorvall Inc.). O resíduo desta centrifugação foi re-extraído com cloreto de sódio 152 mM

e centrifugado. Os sobrenadantes foram reunidos e considerados como sendo o extrato bruto (EB), o qual continha 855 mg de proteína por 90 ml.

2.4. Fracionamento do extrato bruto de massas de ovas de *B. glabrata* com sulfato de amônia.

O EB de MO de *B. glabrata* (90 ml contendo 855 mg de proteína) foi fracionado com sulfato de amônia de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea*, (0-40% de saturação e 40-75% de saturação com sulfato de amônia). A fração de 40-75% de saturação com sulfato de amônia recebeu o nome de FMO-G (15 ml contendo 172 mg de proteína).

2.5. Preparação do extrato bruto de massas de ovas de *B. tenagophila*.

Os exemplares de *B. tenagophila* utilizados no presente trabalho foram coletados em Santos, São Paulo, Brasil. As massas de ovas foram coletadas 6-12 horas após a ovoposição (130 MO por 10 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%). O EB foi preparado de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea*. Para os testes de hemoaglutinação e para os de inibição desta reação por açúcares foi analisada uma preparação de EB contendo 2,84 mg de proteína por ml.

2.6. Preparação do extrato bruto de glândula de albumen de *B. straminea*.

Após esmagamento da concha do molusco entre duas superfícies planas de vidro, as partes moles totais foram separadas dos fragmentos da concha sendo então a glândula de albúmen removida por dissecação. As glândulas de albúmen foram recolhidas em solução de cloreto de sódio 0,9% e mantidas 0-2°C. O EB foi preparado de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea*.

O EB continha 122,15 mg de proteína por 21 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%.

2.7. Fracionamento do extrato bruto de glândula de albúmen de *B. straminea* com sulfato de amônia.

O EB de GA de *B. straminea* (21 ml contendo 122,15 mg de proteína) foi fracionado com sulfato de amônia de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea* (0-40% de saturação e 40-75% de saturação com sulfato de amônia). A fração de 40-75% de saturação com sulfato de amônia recebeu o nome de fração FGA-S (10 ml contendo 10,44 mg de proteína).

2.8. Preparação do extrato bruto de glândula de albúmen de *B. tenagophila*.

O EB de GA (200 GA por 40 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%) de *B. tenagophila* (moluscos provenientes de Curitiba, Paraná, Brasil) foi preparado de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea*.

O EB continha 194 mg de proteína por 40 ml de solu

ção de cloreto de sódio 0,9%.

2.9. Fracionamento do extrato bruto de glândula de albúmen de *B. tenagophila* com sulfato de amônia.

O EB de GA de *B. tenagophila* (40 ml contendo 194 mg de proteína) foi fracionado com sulfato de amônia de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea* (0-40% de saturação e 40-75% de saturação com sulfato de amônia). A fração de 40-75 % de saturação com sulfato de amônia recebeu o nome de fração FGA-T (10 ml contendo 19,1 mg de proteína).

2.10. Preparação do extrato bruto de glândula de albúmen de *B. glabrata*.

O EB de GA (130 GA por 40 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%) de *B. glabrata* (moluscos provenientes de Jacarezinho, Paraná, Brasil) foi preparado de maneira semelhante ao de MO de *B. straminea*. O EB continha 48 mg de proteína por 40 ml de solução de cloreto de sódio.

2.11. Fracionamento do extrato bruto de glândula de albúmen de *B. glabrata* com sulfato de amônia.

O EB de GA de *B. glabrata* (40 ml contendo 48 mg de proteína) foi fracionado com sulfato de amônia de maneira semelhante ao de *B. straminea* (0-40% de saturação e 40-75% de saturação com sulfato de amônia). A fração de 40-75% de saturação com sulfato de amônia recebeu o nome de fração FGA - G

(10 ml contendo 8,85 mg de proteína).

3.0 - MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

3.1. Reação de hemoaglutinação com hemácias humanas.

Os ensaios de hemoaglutinação com lectina de moluscos e os de inibição desta reação por açúcares foram efetuados em cada etapa dos processos de purificação. Nestes testes foi utilizado sangue humano, contendo EDTA-fosfato, como anticoagulante. As hemácias antes de serem utilizadas eram lavadas com solução de cloreto de sódio 0,9% (3 vezes), sendo posteriormente suspensas nesta mesma solução (2:100 v/v) de modo a produzir uma concentração de hemácias de aproximadamente $1,9 \times 10^8$ células por ml.

Os ensaios de hemoaglutinação foram efetuados, misturando-se 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% com 0,1 ml da solução de lectina e adicionando-se em seguida 0,02 ml de sangue contendo aproximadamente $3,8 \times 10^5$ células. As leituras da reação de hemoaglutinação foram realizadas 6 horas após a preparação do sistema. Com esta finalidade colocava-se uma gota desta suspensão celular sobre uma lâmina de vidro observando-se em seguida a reação de hemoaglutinação ao microscópio. Uma escala sorológica de (-), significando ausência de qualquer aglutinação (hemácias totalmente isoladas) e de (++++), significando aglutinação máxima (nenhuma hemácia isolada), foi

estabelecida para avaliar o grau de hemoaglutinação.

Em virtude da dificuldade de se estabelecer uma unidade de hemoaglutinação, para melhor seguir o processo de purificação da lectina, o fator hemoaglutinante, como sugerido por SAMPAIO et al.⁷⁰, foi utilizado nesta investigação, numa tentativa para visualizar, de maneira semi-quantitativa o processo de purificação das lectinas de moluscos. O fator hemoaglutinante é determinado, dividindo-se o inverso do título de hemoaglutinação pela mínima quantidade de proteína (mg) capaz de promover tal aglutinação (++++). O título de hemoaglutinação é conceituado como sendo o número que corresponde à maior diluição em que se obtém uma aglutinação máxima (++++), com uma determinada amostra.

3.2. Reação de hemoaglutinação com hemácias de coelho e de embrião de galinha.

Os testes de hemoaglutinação utilizando-se hemácias de coelho e de embrião de galinha, foram feitos com o seguinte sistema de reação: 0,1 ml de solução de EB de MO de *B. straminea*, 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% e 0,02 ml de suspensão de hemácias a 2%. Não foi observada hemoaglutinação com as hemácias destes animais, mesmo após 24 horas de reação.

3.3. Inibição da reação de hemoaglutinação por açúcares.

Os ensaios de inibição das reações de hemoaglutina

ção, como descrito em 3.1 havendo apenas adição em cada caso de 2,5 a 100 μ moles de cada um dos seguintes açúcares: D-glucose, D-manose, D-glucosamina, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, L-sorbose, D-frutose, D-fucose, D-rafinose, metil β -D-glucopiranosídeo, D-turanose, D-tagatose, D-melizitose, D-melibiose, até obter-se a mínima quantidade de açúcar necessária para inibir totalmente a reação de hemoaglutinação.

3.4. Efeito de cationes divalentes sobre a reação de hemoaglutinação.

Para se verificar o efeito estimulante de cationes divalentes sobre a reação de hemoaglutinação, 0,1 ml de soluções de cada um dos seguintes sais: CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 (20 μ moles) era acrescentado ao sistema de reação como descrito em 3.1. As leituras de hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema.

3.5. Efeito do íon Mg^{++} sobre a ação dos açúcares inibidores da reação de hemoaglutinação.

Com a finalidade de estudar o efeito do íon Mg^{++} sobre a ação dos açúcares inibidores da reação de hemoaglutinação foi utilizado um sistema de reação semelhante ao descrito para o estudo dos açúcares inibidores da reação de hemoaglutinação ao qual foi adicionado cloreto de magnésio (20 μ moles).

O cloreto de magnésio não alterou o efeito inibidor dos açúcares.

Os açúcares e suas respectivas concentrações encontram-se descritos na tabela I.

TABELA I - Concentração de carboidratos (μ moles) utilizados na reação de inibição da hemoaglutinação, na presença de íons Mg^{++} .

CARBOIDRATOS	FRAÇÕES					
	FGA-S	FGA-G	FGA-T	FMO-S	FMO-G	EB-MO-T
D-fucose	9,0	40,0	25,0	9,0	30,0	9,0
D-manose	7,0	25,0	25,0	25,0	30,0	9,0
D-frutose	9,0	35,0	25,0	7,0	35,0	2,5
L-sorbose	7,0	50,0	50,0	7,0	50,0	25,0
N-acetil-D-glucosamina	7,0	30,0	25,0	25,0	45,0	12,5

-EB-MO-T significa extrato bruto de massas de ovas de *B. tenagophila*.

3.6. Diálise do EB de MO de *B. straminea* contra ácido acético.

Um experimento foi realizado com a finalidade de remover os íons de uma preparação de EB de MO de *B. straminea* que apresentava um título de hemoaglutinação de 1:32. Este EB foi dializado contra ácido acético 2M (500 ml) durante

48 horas à temperatura de 2-4°C. O material não dializável foi em seguida dializado contra uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 x 500 ml). Após este tratamento, o material não dializável não apresentou atividade hemoaglutinante. Entretanto a atividade hemoaglutinante deste material foi 100% restaurada após a adição de cloreto de magnésio ao meio de reação.

3.7. Efeito de EDTA sobre a reação de hemoaglutinação.

Com esta finalidade foram utilizados dois sistemas de reação: A) 0,10 ml de EB de MO de *B. straminea*, 0,02 ml de suspensão de hemácias a 2% e 0,10 ml de EDTA de diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,25 e 0,5 μmol) de EDTA dissolvido em cloreto de sódio 0,9%); B) semelhante ao sistema A) ao qual foi acrescentado 0,10 ml de solução de cloreto de magnésio 20 μmoles em cloreto de sódio 0,9%.

As reações de hemoaglutinação não foram inibidas com EDTA nas concentrações abaixo 0,25 μmol , mesmo após 24 horas de reação. Com EDTA nas concentrações de 0,25 e 0,50 μmol , houve completa inibição da reação de hemoaglutinação, a qual foi parcialmente revertida (30 e 15%, respectivamente) após a adição da solução de cloreto de magnésio.

As leituras desta última reação foram feitas após 6 horas do início de reação, já que o EDTA em concentrações elevadas (0,25 e 0,50 μmol) hemolisa as hemácias, após 24 horas de reação. Entretanto, nos sistemas contendo cloreto de magnésio não foi observado hemólise, mesmo após 24 horas de reação.

3.8. Efeito do soro anti-A e anti-B na reação de inibição da hemoaglutinação por carboidratos.

Com a finalidade de se estudar o efeito do soro anti-A e anti-B na reação de inibição da hemoaglutinação por carboidratos, foram utilizados os seguintes sistemas de reação :
a) 0,1 ml de solução de lectina (FMO-S, FMO-G, FGA-S e FGA-G); 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% contendo o açúcar inibidor da reação de hemoaglutinação e 0,02 ml de hemácias A 2%. b) 0,1 ml de solução de lectina (FMO-G e FGA-G); 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% contendo o açúcar inibidor da reação de hemoaglutinação e 0,02 ml de hemácias B 2%.

Após 12 horas não houve reação de hemoaglutinação.

Quando, foi acrescentado 0,1 ml de soro anti-A e anti-B (diluídos 1:100 v/v) aos sistemas "a" e "b" obteve-se 100% de hemoaglutinação em ambos os sistemas.

3.9. Reação de hemoaglutinação em presença de soro antiB e de D-galactose.

Com a finalidade de se estudar o efeito do soro anti-B e da D-galactose sobre a reação de hemoaglutinação, o seguinte sistema de reação foi usado: 0,1 ml de soro anti-B (diluído 1:100 v/v); 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 % (contendo 50 μ moles de D-galactose) e 0,02 ml de suspensão de hemácias B a 2%, em solução de cloreto de sódio 0,9%.

Após 12 horas de reação, não houve hemoaglutinação.

Em seguida foi acrescentado a este sistema 0,1 ml de lectina anti-(A+B) (FGA-G), obtendo-se então 100% de hemoaglutinação.

3.10 - Remoção do EDTA, do EB de massas de ovas de *B. straminea*, por diálise.

EB de MO de *B. straminea* (0,5 ml) foi acidionado à uma solução de EDTA 1,25µmoles (0,5 ml). Este permaneceu em repouso por 20 minutos, à temperatura de 2-4°C, sendo então dializado contra uma solução de cloreto de sódio 0,9 (3 x 500 ml), por 24 horas à temperatura de 2-4°C.

RESULTADOS

No extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* foi detectada atividade hemoaglutinante com hemácias humanas (sistema sanguíneo ABO) enquanto que com hemácias de embrião (de 1 dia) de galinha e com hemácias de coelho não foi detectada atividade hemoaglutinante.

O extrato bruto de *B. straminea* (MO de GA) e *B. tenagophila* (MO) apresentaram a mesma especificidade hemoaglutinante, aglutinando fortemente (++++) hemácias A e fracamente (+) hemácias B.

O extrato bruto de massas de ovas de *B. glabrata*, aglutinou igualmente (++++) hemácias A, B e AB. Nenhum destes extratos apresentou atividade hemoaglutinante com hemácias O (Tabela II).

Os títulos de hemoaglutinação do extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* bem como o de glândulas de albúmen de *B. straminea* encontram-se resumidos na Tabela III.

O extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea*, *B. glabrata* e de glândula de albúmen de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram inicialmente fracionados com sulfato de amônio, na faixa de saturação de 0-40% e de 40-75 % (Tabelas IV, V, VI, VII e VIII).

O efeito estimulador dos íons divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} e Mn^{++}) foi investigada sobre a reação de hemoaglu

tinação de lectina de moluscos do gênero *Biomphalaria*. Apenas o iante Mg^{++} , apresentou efeito estimulador na reação de hemoaglutinação de massas de ovas e de glândula de albúmen de *B. straminea* (Tabelas IX e X), *B. glabrata* (Tabelas XI e XII), e *B. tenagophila* (Tabela XIII).

O título de hemoaglutinação da fração FGA-S foi alcançado em 3,5 horas, na ausência (Tabela XIV, título 1:4) e na presença do iante Mg^{++} (Tabela XV, título 1:8), permanecendo então constante até 24 horas.

As lectinas de glândula de albúmen e de massas de ovas de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*, são inibidas inespecificamente por vários carboidratos, conforme demonstram os dados das Tabelas XVI, XVII, XVIII, XIX, XX e XXI. Entretanto observou-se que ceto-hexoses, (D-frutose, L-sorbose, e D-tagatose) são os inibidores genéricos destas lectinas. De um modo geral, os inibidores da lectina de massas de ovas, de um determinado molusco, são também os inibidores da lectina da glândula de albúmen.

A fração FMO-S, obtida do extrato bruto de *B. straminea* por precipitação com sulfato de amônia (40-75% de saturação), foi purificada por cromatografia de afinidade, em coluna de Sephadex G-75-120, usando-se como eluente, D-frutose 0,2M (Figura 1). Os dados referentes à purificação desta lectina encontram-se resumidos na Tabela XXII, demonstrando que houve uma purificação eficiente da fração FMO-S (11,6 vezes), tomando-se como base o fator hemoaglutinante.

Esta fração purificada (FMO-S-P) apresentou uma faixa de proteína em eletroforese em gel de poliacrilamida em pH 4,5 (Figura 2). Por eletrofocalização em gel de poliacrilamida também foi obtida uma única faixa de proteína, a qual focalizou em pH 7,6 (Figura 3).

A lectina de massas de ovas de *B. straminea* purificada por cromatografia de afinidade, apresentou um alto valor do título de hemoaglutinação (1:2048/70 ng de proteína), conforme demonstram os dados da Tabela XXIII.

O íon Mg^{++} não apresentou efeito sobre a ação dos açúcares inibidores da reação de hemoaglutinação de massas de ovas, e de glândula de albúmen de *B. glabrata*, *B. straminea*, e *B. tenagophila*.

EB de massas de ovas de *B. straminea* não apresentou atividade hemoaglutinante com hemácias de coelho ou de embrião de galinha.

Experimento feito com soro anti-B e o carboidrato inibidor deste soro (D-galactose), demonstrou que o sítio de ligação da lectina de glândula de albúmen de *B. glabrata* na hemácia, não é o mesmo daquele ocupado pelo soro anti-B.

EDTA (0,25 μ mol) inibiu completamente a reação de hemoaglutinação da lectina de massas de ovas de *B. straminea*. Esta inibição foi revertida parcialmente (30%), após a adição de cloreto de Mg^{++} ao meio de reação.

Remoção do EDTA, do EB de massas de ovas de *B. straminea*, por diálise contra cloreto de sódio 0,9% restaurou 100% da atividade hemoaglutinante.

TABELA II - Hemoaglutinação de lectina de EB de *B. straminea*,
B. tenagophila e *B. glabrata*.

Grupo Sanguíneo	Reação com EB de			
	<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. Glabrata</i>	
	MO	GA	MO	MO
A	++++	++++	++++	++++
B	+	+	+	++++
AB	++	++	++	++++
O	-	-	-	-

- EB significa extrato bruto.
- MO significa massas de ovas.
- GA significa glândula de albúmen.
- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação microscópica 6 horas após a preparação do sistema como descrito em 3.1.
- Os EB de MO de *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* continham 9,3, 2,84, 9,5 mg de proteína por ml. respectivamente, enquanto que o EB de GA de *B. straminea*, continha 5.82 mg de proteína por ml.

TABELA III - Títulos de hemoaglutinação de EB de *B. straminea*,
B. glabrata e *B. tenagophila*.

Molusco	Grupo Sanguíneo	Diluições do EB											
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
<i>B.straminea</i> (MO)	A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-	
<i>B.straminea</i> (GA)	A	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	-	-	-	-	
<i>B.tenagophila</i> (MO)	A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	
<i>B.glabrata</i> (MO)	A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	-	-	
	B	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	-	-	

EB significa extrato bruto.

- MO significa massas de ovas.

- GA significa glândula de albúmen.

- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação microscópica 6 horas após a preparação do sistema como descrito em 3.1.

- O título de hemoaglutinação do EB de MO de *B. straminea* (1:32), de *B. tenagophila* (1:32) e *B. glabrata* (1:64) foram obtidos com 0,0289, 0,0087 e 0,0148 mg de proteína, respectivamente. O título de hemoaglutinação da GA de *B. straminea* (1:8) foi obtido com 0,0725 mg de proteína.

TABELA IV - Fracionamento do EB de MO de *B. straminea* por sulfato de amônia.

Fração	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Título de hemoaglutinação	Proteína para aglutinação máxima
EB	35,0	324,6	1:32	0,029
Saturação 0-40% (NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	1,6	1:4	0,250
Saturação 40-75% (NH ₄) ₂ SO ₄ (FMO-S)	10,0	51,5	1:64	0,008

- EB significa extrato bruto.

- Sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA V - Fracionamento do EB de MO de *B. glabrata* por sulfato de amônia.

Fração	Volume total (ml)	Proteína (total) (mg)	Título de hemoaglutinação	Proteína (mg) para aglutinação máxima
EB	90,0	855,0	1:64	0,0148
Saturação 0-40% (NH ₄) ₂ SO ₄	15,0	39,0	1	0,2600
Saturação 40-75% (NH ₄) ₂ SO ₄ (FMO-G)	15,0	172,5	1:64	0,0179

- EB significa extrato bruto.

- Sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA VI - Fracionamento do EB de GA de *B. straminea* por sulfato de amônia.

Fração	Volume total (mg)	Proteína total (mg)	Título de hemoaglutinação	Proteína(mg) para aglutinação máxima
EB	21,0	122,15	1:8	0,0725
Saturação 0-40% (NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	12,0	1:2	0,1000
Saturação 40-75 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (FGA-S)	10,0	10,44	1:4	0,0260

- EB significa extrato bruto.

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA VII - Fracionamento do EB de GA de *B. glabrata* por sulfato de amônia.

Fração	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Título de hemoaglutinação	Proteína (mg) para aglutinação máxima
EB	40,0	48,0	1:16	0,0075
Saturação 40-75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0	5,31	1:12	0,0027
Saturação 40-75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (FGA-G)	10,0	8,85	1:16	0,0055

- EB significa extrato bruto

- Sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA VIII - Fracionamento do EB de GA de *B. tenagophila* por sulfato de amônia.

Fração	Volume total (ml)	Título de hemoaglutinação	Proteína para aglutinação máxima	Proteína total (mg)
EB	40,0	1:64	0,0075	194,0
Saturação 0-40% (NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	1:8	0,0820	19,7
Saturação 40-75% (NH ₄) ₂ SO ₄ (FGA-T)	10,0	1:32	0,0059	19,1

- EB significa extrato bruto.

- Sistema utilizado encontra se descrito em 3.1.

TABELA IX - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação de lectina de MO de *B. straminea*.

Fração	Título de hemoaglutinação		Proteína (mg) para aglut. máx.		Fator hemoaglutinante/1000	
	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}
EB	1:32	1:1024	0,02900	0,00090	1,11	1137,0
FMO-S	1:64	1:2048	0,00800	0,00025	8,0	8192,0

- EB significa extrato bruto.
- O sistema com Mg^{++} encontra-se descrito em 3.4.
- O sistema sem Mg^{++} encontra-se descrito em 3.1.
- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA X - Efeito estimulador do íon Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação de GA de *B. straminea*.

Fração	Título de hemoa- glutinação		Proteína (mg) pa- ra aglut. máx.		Fator hemoaglu- tinante/1000	
	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}
EB	1:8	1:8	0,0725	0,0725	0,110	0,110
Saturação 0-40% (NH_4) ₂ SO ₄	1:2	1:4	0,1000	0,0500	0,020	0,080
FGA-S	1:4	1:8	0,0260	0,0130	0,154	0,613

- EB significa extrato bruto.
- O sistema com Mg^{++} encontra-se descrito em 3.4.
- O sistema sem Mg^{++} encontra-se descrito em 3.1.
- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XI - Efeito estimulador do ionte Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação da lectina de MO de *B. glabrata*.

Fração	Título de hemoaglutinação		Proteína (mg) para aglut. max.		Fator hemoaglutinante/1000	
	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}
FMO-G	1:64	1:1024	0,018	0,001	3,57	930,00

- O sistema com Mg^{++} encontra-se descrito em 3.4.
- O sistema sem Mg^{++} encontra-se descrito em 3.1.
- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- As leituras da hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XII - Efeito estimulador do ionte Mg^{++} sobre a reação de lectina de GA de *B. glabrata*.

Fração	Título de hemoaglutinação		Proteína (mg) para aglut. max.		Fator hemoaglutinante/1000	
	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}
FGA-G	1:16	1:256	0,00550	0,00034	2,91	740,50

- O sistema com Mg^{++} encontra-se descrito em 3.4.
- O sistema sem Mg^{++} encontra-se descrito em 3.1.
- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XIII - Efeito estimulador do iante Mg^{++} sobre a reação de hemoaglutinação da lectina de GA de *B. tenagophila*.

Fração	Título da hemoa- glutinação		Proteína (mg) para aglut. máx.		Fator hemoaglu- tinante/ 1000	
	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}	sem Mg^{++}	com Mg^{++}
FGA-T	1:32	1:512	0,00590	0,00037	5,42	1372,65

- O sistema com Mg^{++} encontra-se descrito em 3.4.
- O sistema sem Mg^{++} encontra-se descrito em 3.1.
- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XIV - Título de hemoaglutinação da fração FGA-S da GA
de *B. straminea*, em função do tempo.

Tempo (h)	Diluições				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1	++++	+++	-	-	-
1,5	++++	++++	+	-	-
2,5	++++	++++	++	-	-
3,5	++++	++++	++++	+	-
4,5	++++	++++	++++	++	-
5,5	++++	++++	++++	++	-
12,0	++++	++++	++++	++	-
24,0	++++	++++	++++	++	-

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA XV - Efeito estimulador do ionte Mg^{++} sobre o título de hemoaglutinação da fração FGA-S de GA de *B. straminea*, em função do tempo.

Tempo (h)	Diluições					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1,0	++++	++++	-	-	-	-
1,5	++++	++++	+++	-	-	-
2,5	++++	++++	++++	+++	-	-
3,5	++++	++++	++++	++++	++	-
4,5	++++	++++	++++	++++	++	-
5,5	++++	++++	++++	++++	++	-
12,0	++++	++++	++++	++++	++	-
24,0	++++	++++	++++	++++	++	-

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.4.

TABELA XVI - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FMO-S de MO de *B. straminea*.

Carboidrato	µmoles	Inibição (%)
D-frutose	7,0	100
L-sorbose	7,0	100
L-fucose	9,0	100
D-manose	25,0	100
N-acetil-D-glucosamina	25,0	100
D-glucose	25,0	100
D-celobiose	30,0	100
D-turanose	40,0	100
Sacarose	50,0	100
D-melizitose	50,0	100
metil-β-D-glucopiranosídeo	50,0	100
N-acetil-D-galactosamina	50,0	100
β-lactose	50,0	100
L-rhamnose	50,0	50
D-galactosamina	50,0	25
D-glucosamina	50,0	25
D-galactose	50,0	5
D-melibiose	50,0	0

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.

- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação ao microscópio, 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XVII - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FMO- S de MO de *B. glabrata*.

Carboidrato	μ moles	Inibição (%)
L-fucose	30	100
D-manose	30	100
D-frutose	30	100
N-acetil-D-galactosamina	45	100
N-acetil-D-glucosamina	45	100
L-sorbose	50	50
D-turanose	50	50
D-galactose	100	40
D-glucose	50	25
Sacarose	50	15
D-celobiose	50	10
D-glucosamina	100	10
L-rhamnose	30	0

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação ao microscópio 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XVIII - Inibição da reação de hemoaglutinação do EB de MO de *B. tenagophila*.

Carboidrato	μ moles	Inibição (%)
D-frutose	2,5	100
L-fucose	9,0	100
D-manose	9,0	100
D-tagatose	10,0	100
N-acetil-D-galactosamina	12,5	100
N-acetil-D-glucosamina	12,5	100
L-sorbose	25,0	100
D-glucose	25,0	100
D-celobiose	25,0	100
D-turanose	25,0	100
Metil- β -D-glucopiranosídeo	25,0	100
D-glucosamina	50,0	90
D-melizitose	50,0	90
D-galactosamina	50,0	20
D-galactose	50,0	20
L-raminose	30,0	10

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação ao microscópio 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XIX - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FGA-S da glândula de albúmen de *B. straminea*.

Carboidrato	µmoles	Inibição (%)
L-sorbose	7,0	100
N-acetil-D-galactosamina	7,0	100
N-acetil-D-glucosamina	7,0	100
D-galactose	7,0	100
D-manose	7,0	100
D-frutose	9,0	100
D-celobiose	9,0	100
D-turanose	9,0	100
L-fucose	9,0	100
D-tagatose	10,0	100
D-melizitose	12,5	100
Metil-β-D-glucopiranosídeo	12,5	100
D-glucose	25,0	100
Sacarose	25,0	100
L-raminose	30,0	100
D-glucosamina	50,0	50

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação microscópica 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XX - Inibição da reação de hemoaglutinação da FGA-F de GA de *B. glabrata*.

Carboidrato	μmoles	Inibição (%)
D-manose	25	100
N-acetil-D-glucosamina	30	100
N-acetil-D-galactosamina	30	100
D-frutose	30	100
L-fucose	40	100
L-sorbose	50	100
Sacarose	50	80
D-tagatose	10	75
D-turanose	50	70
D-celobiose	50	60
D-glucosamina	40	0
D-galactose	50	0
D-glucose	50	0

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação ao microscópio 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XXI - Inibição da reação de hemoaglutinação da fração FGA-T da GA de *B. tenagophila*.

Carboidrato	µmoles	Inibição (%)
D-tagatose	10,0	100
L-fucose	12,5	100
D-frutose	25,0	100
D-manose	25,0	100
N-acetil-glucosamina	25,0	100
D-celobiose	25,0	100
Sacarose	25,0	100
L-sorbose	50,0	100
N-acetil-D-galactosamina	50,0	100
D-glucose	50,0	100
D-turanose	50,0	100
D-sorbose	50,0	100
Metil-β-D-glucopiranosideo	50,0	100
D-galactose	50,0	100
L-rhamnose	30,0	50

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.3.
- As leituras de hemoaglutinação foram feitas por observação ao microscópio 6 horas após a preparação do sistema, como descrito em 3.1.

TABELA XXII - Purificação da lectina de MO de *B. straminea*.

Fração	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Título de hemoaglutinação	Proteína (mg) para aglut.max.	Fator hemoaglutinante/1000
Extrato bruto (EB)	35,0	324,6	1:1024	0,000900	1.137
Saturação (40-75%) (NH ₄) ₂ SO ₄ (FMO-S)	10,0	51,5	1:2048	0,000250	8.192
Eluato Sephadex G-75-120 (FMO-S-P)	11.0	8,7	1:2048	0,000077	13.257

- O fator hemoaglutinante é definido em 3.1.
- Aglut. máx. significa aglutinação máxima.
- Sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.

TABELA XXIII - Título de hemoaglutinação da fração FMO-S-P de MO de *B. straminea*.

Grupo Sanguíneo	Diluições												
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++

- O sistema utilizado encontra-se descrito em 3.1.
- O título de hemoaglutinação da fração FMO-S-P em 3.1 foi obtido com 0,077 µg de proteína.

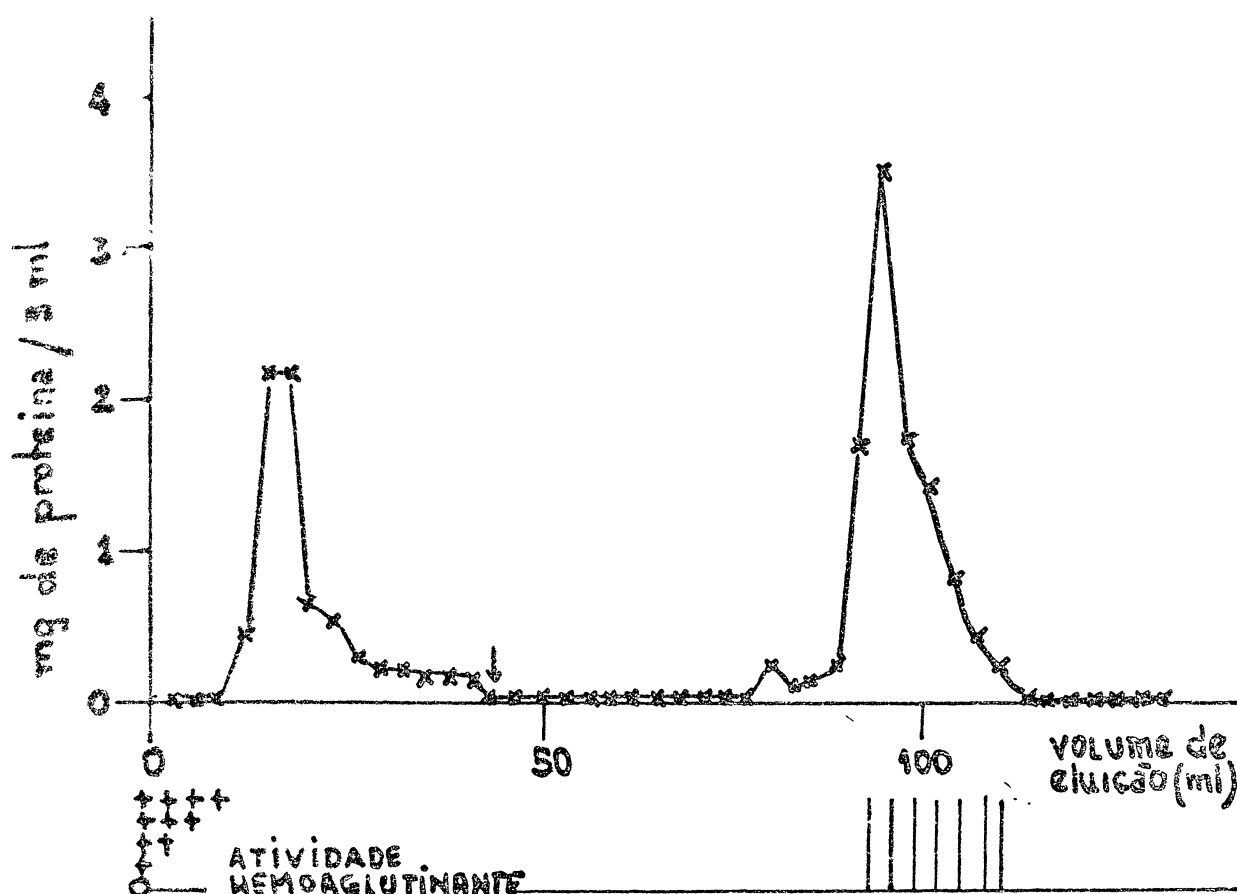


FIGURA 1 - Cromatografia da fração FMO-S em coluna de Sephadex G-75-120 (2,5 x 25.0 cm).

Como eluente foi utilizado uma solução de cloreto de sódio 152 mM contendo 10 mM de cloreto de magnésio e no ponto indicado pela seta foi acrescentado D-frutose (0,2 M) a esta solução. A velocidade de escoamento da solução eluente foi de 3-5 ml por hora. Frações de 30 ml foram coletadas (coletor de frações) a 0-4°C. Proteínas foram determinadas pelo processo de LOWRY et al.⁴⁸. A atividade hemoaglutinante foi determinada como descrito em 3.4. A fração com atividade hemoaglutinante, foi eluída entre 93-111 ml e continha 8,7 mg de proteína. O volume de exclusão com referência a Sephadex Azul foi de 33 ml.



FIGURA 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração FMO-S-P.

Foi utilizada uma concentração de gel de 7,5% em tubos de 0,6 x 9,0 cm, com tampão alanina ácido acético 0,025 M pH 4,5, segundo a técnica de GABRIEL ²².

Amostra (0,1 ml) contendo 40 µg de proteína foi submetida a uma corrente de 350 V e 3 mA/tubo, por 2 horas.

A coloração da proteína foi feita com comassie brilliant blue, durante 12 horas. A descoloração do gel foi efetuada com ácido tricloroacético (12,5%) por 12 horas à temperatura ambiente.

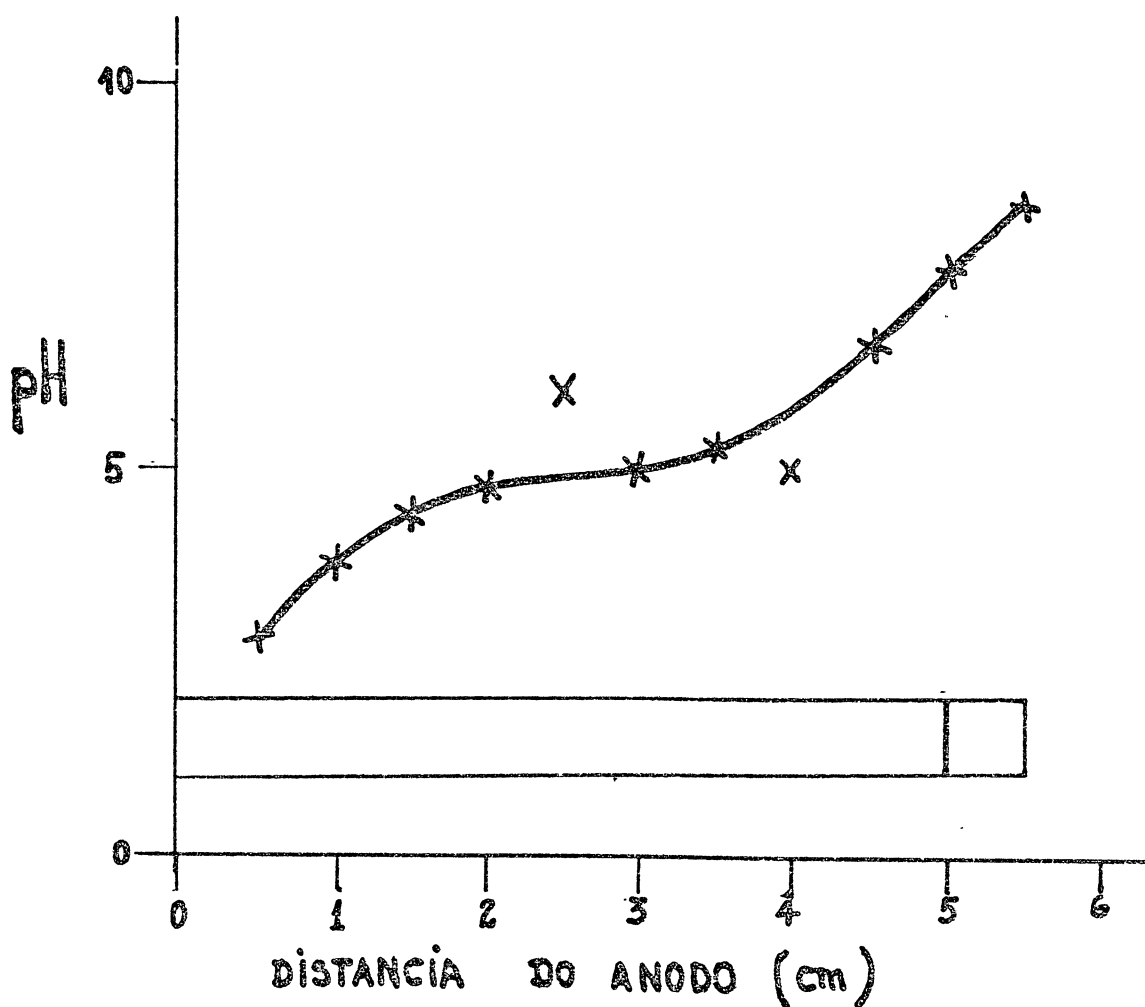


FIGURA 3 - Eletrofocalização em gel de poliacrilamida da fração FMO-S-P.

Utilizando Ampholine de pH 3-10, segundo a técnica de WRIGLEY⁸⁷. A amostra de proteína (40 μ g) foi submetida a um potencial de 350 V por 4,5 horas a 4°C.

DISCUSSÃO

Na revisão de PAULEY⁵⁸ sobre caracterização de aglutininas de invertebrados e de plantas, são citadas várias aglutininas com propriedade de aglutinar protozoários, bactérias, células sanguíneas ou espermatozóides de invertebrados.

Embora as lectinas apresentem múltiplas propriedades, na presente investigação foi testada apenas a atividade hemoaglutinante (sistema ABO) das lectinas de massas de ovas de moluscos do gênero *Biomphalaria*, em virtude de facilidade de observação do efeito de inibidores e estimuladores desta reação, mesmo que a hemoaglutinação não tenha relação direta com a especificidade fisiológica destas lectinas.

O extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea* e *B. tenagophila*, apresentam atividade anti-A, enquanto que nas massas de ovas de *B. glabrata*, é do tipo anti-(A+B). SAMPAIO et al.⁷⁰ já haviam verificado a presença de lectinas anti-A e anti-(A+B) em glândula de albúmen de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, respectivamente.

No presente trabalho determinou-se a atividade lectínica em glândula de albúmen de *B. straminea* a qual não tinha sido ainda investigada.

Estes dados demonstram que a atividade hemoaglutinante das massas de ovas dos moluscos investigados é semelhante ao da glândula de albúmen do molusco correspondente.

MELO & PARAENSE⁵⁴ observaram variação na atividade da lectina de glândula de albúmen de moluscos, para o sis-

tema ABO, de acordo com a distribuição geográfica. O extrato bruto de glândula de albúmen de *B. glabrata*, o qual fora coletado nos Estados do Paraná e Bahia bem como na Venezuela apresentava a mesma atividade lectínica, anti-(A+B) observada por SAMPAIO et al.⁷⁰, enquanto que o *B. glabrata* proveniente do Maranhão, apresentava atividade hemoaglutinante apenas com hemácias A₁.

Estas variações na atividade hemoaglutinante de lectinas de acordo com a distribuição geográfica também foram assinaladas por PORETZ et al.⁵⁹ em aglutinina de origem vegetal (sementes de *Sophora japonica*) a qual apresentava variação na atividade anti-O. Atividade hemoaglutinante anti-A parece ser predominante nos moluscos da classe Gastropoda, de acordo com revisão de TEMBERTON,⁷⁹ a qual demonstra que os moluscos desta classe apresentam atividade anti-A (25%), anti-B (5%), anti-(A+B) (5%) além de 25% com atividade indeterminada (outros sistemas diferentes de ABO).

Das dezesseis espécies de moluscos da família Planorbidae que foram incluídas nesta revisão, apenas *Biomphalaria alexandrinus* (Ehrenberg) e *Bulinus truncatus* (Audouin) apresentavam atividade anti-A enquanto as demais espécies não continham aglutininas para o sistema ABO.

Com relação a purificação das lectinas de moluscos, observa-se que apenas um pequeno número tem sido obtido em alto grau de purificação, como a de glândula de albúmen de *Helix pomatia*³² e *B. glabrata*⁷⁰.

Embora lectina de massas de ovas de moluscos tenha

sido primeiramente investigada por UHLENBRUCK et al.⁸⁴ em *Helix pomatia*, não foi ainda relatado nenhum trabalho sobre purificação de tais lectinas.

O processo de purificação utilizado baseiou-se na propriedade de certas lectinas de ligarem-se a gel de dextrano^{2,3,84}, sendo esta interação lectina-gel inibida por açúcares específicos. Sephadex G-75-120 (coluna de 2,5 x 25 cm) mostrou eficiente interação com a lectina de massas de ovas de *B. straminea*, a qual foi demonstrada pela eluição específica desta lectina por D-frutose. Este açúcar juntamente com L-sorbose, apresentam maior efeito inibidor sobre a reação de hemoaglutinação desta lectina.

Utilizando-se este processo obteve-se esta lectina homogênea por eletroforese em gel de poliacrilamida (pH 4,5) e por eletrofocalização em gel de poliacrilamida (pI de 7,6).

Por este método foi obtido um rendimento de 9% de proteínas com atividade hemoaglutinante. Esta lectina continha 31% de açúcar (fenol ácido sulfúrico), podendo ser classificada como glicoproteína. SAMPAIO et al.⁷⁰ encontrou 6% de D-galactose e 1% de hexosamina na lectina purificada de glândula de albúmen de *B. glabrata*.

A lectina de sementes de *Dolichos biflorus*, altamente purificada por cromatografia de afinidade, apresentou atividade anti-A, até uma concentração de 10 µg/ml⁴⁵, enquanto que a lectina de glândula de albúmen de *B. glabrata*, purificada por SAMPAIO et al.⁷⁰ foi ativa, anti-(A+B), até uma concentração de 1,3 µg de proteína. O processo de purificação, u

tilizado no presente trabalho, permitiu obter-se, lectina de massas de ovos *B. straminea*, apresentando um título de hemoaglutinação de 1:2048, com apenas 0,077 µg de proteína (em presença de Mg^{++}). Este resultado demonstra o alto grau de purificação desta lectina quando comparado com o da lectina de *D. biflorus* e de *B. glabrata*.

Embora outros métodos de cromatografia de afinidade tenham sido testados sem sucesso (ligação Sepharose-vinil sulfone-D-manose ou D-frutose) o processo de purificação utilizado no presente trabalho é muito promissor para obtenção desta lectina em escala preparativa em virtude de sua simplicidade, baixo custo e alto rendimento.

As demais lectinas não foram ainda investigadas por cromatografia de afinidade, sendo apenas purificadas parcialmente por fracionamento com sulfato de amônia, a fim de estudar-se o efeito de açúcares inibidores e de iões estimuladores da reação de hemoaglutinação.

Diversas lectinas são metaloproteínas^{5,26,34,45,47}. Os iões metálicos associados a essa lectinas não são necessariamente aqueles que estimulam a reação de hemoaglutinação^{45,76}. Em geral, a reação de hemoaglutinação de lectinas é estimulada por mais de um ião divalente, como ocorre na lectina de *D. biflorus*, a qual é estimulada por Ca^{++} , Co^{++} , Ni^{++} e Mg^{++} , embora a análise de absorção atômica tenha demonstrado a ausência de Co^{++} e Ni^{++} na lectina purificada⁴⁵. O efeito estimulador de iões divalentes foi estudado com maiores detalhes na concanavalina A, a qual é ativada por iões Ca^{++} e

Mn^{++} , sendo o íon manganês necessário para a ligação do cálcio a esta lectina. A interação açúcar-lectina requer a presença destes íons, cuja remoção resulta na perda da capacidade desta lectina ligar-se a carboidratos ^{41,42,71}.

Também foi observada que a concanavalina A privada de íons Ca^{++} , Mn^{++} e Mg^{++} (por diálise) não cristaliza como ocorre normalmente após a adição destes íons ⁷⁶.

Até o presente, não foi demonstrado se as lectinas de moluscos são metaloproteínas, ou apenas estimuladas por íons divalentes.

No presente trabalho, foi tentado esclarecer apenas se as lectinas de massas de ovas e de glândula de albúmen de moluscos do gênero *Biomphalaria* são estimuladas por íons divalentes como ocorre com certas lectinas vegetais ^{5,26,45,47,59}.

Neste particular, as lectinas de moluscos deste gênero são estimuladas apenas pelo íon Mg^{++} , sendo que os íons Ca^{++} , Co^{++} e Mn^{++} não apresentaram nenhum efeito estimulador.

A lectina de massas de ovas de *B. straminea*, *B. glabrata*, bem como a de glândula de albúmen de *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram altamente estimuladas pelo íon Mg^{++} , na concentração de 20 μ moles. Na lectina de extrato bruto de glândula de albúmen de *B. straminea* o íon Mg^{++} não apresentou efeito estimulador, embora um discreto efeito tenha sido observado nesta lectina parcialmente purificada por sulfato de amônia e exaustivamente dializada (título hemoaglutinante de 1:4 passou para 1:8).

Exceto a aglutinina de *B. simplicifolia*³⁴ que é estimulada 100% por apenas um íon divalente (Ca^{++}), as lectinas de moluscos do gênero *Biomphalaria* são as únicas descritas a formarem um grupo que apresenta um estimulador em comum (íon Mg^{++}).

A desmetalização de extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea* (título de 1:32) por diálise contra ácido acético 2N e posterior diálise contra solução de cloreto de sódio 0,9%, ocasionou inibição total da atividade hemoaglutinante a qual foi reversivelmente restaurada (100%) pela adição de cloreto de magnésio (20 μmoles). Este experimento juntamente com o do efeito estimulador pelo íon Mg^{++} sugere que esta lectina é realmente dependente de íon Mg^{++} .

O efeito do EDTA (0,25 μmol) sobre a lectina de massas de ovas de molusco não é muito conclusivo. Em presença de EDTA (0,25 μmol) a atividade lectínica do extrato bruto de massa de ovas *B. straminea* foi completamente inibida, sendo que após 6 horas de reação, houve total hemólise. Num experimento semelhante utilizando - se cloreto de magnésio (20 μmol) houve apenas 30% de restauração da atividade hemoaglutinante, mas não ocorreu hemólise mesmo após 24 horas de reação. Em outro experimento, em que EDTA (0,25 μmol) foi acrescentado ao sistema contendo lectina de extrato bruto de massas de ovas de *B. straminea* e em seguida removido por diálise exaustiva contra cloreto de sódio 0,9%, houve restauração total da atividade hemoaglutinante.

Estes dados sugerem que a inativação da lectina pe-

lo EDTA é devida mais a formação de um complexo reversível lectina-EDTA, sem atividade hemoaglutinante, do que mesmo a uma desmetalização da lectina.

Esta mesma sugestão foi feita por KOCOUREK et al.⁴⁵ e TUNIS⁸⁰ quando estudaram o efeito do EDTA sobre as lectinas de *D. biflorus* e *P. vulgaris*, respectivamente.

Uma das propriedades fundamentais das lectinas é a capacidade ligante à açúcares, formando complexo açúcar-lectina. Esta reatividade pode ocorrer com os açúcares que se encontram expostos na superfície de células ou com açúcares que foram acrescentados ao meio de reação. Tais açúcares, funcionam geralmente como inibidores competitivos da reação.

A maioria das propriedades biológicas atribuídas às lectinas dependem de sua capacidade ligante à açúcares que se encontram expostos na superfície das células de invertebrados, vertebrados, bactérias, protozoários e espermatozóides ou de ligarem-se a macro-moléculas contendo açúcares.

Investigando-se o efeito dos açúcares inibidores sobre a reação de hemoaglutininação de lectinas de moluscos do gênero *Biomphalaria*, observou-se que um grande número de açúcares inibiam a reação de hemoaglutininação. Apesar disto verificou-se que as ceto-hexoses (D-frutose, L-sorbose, D-tagatose) foram os inibidores comuns a estas lectinas, seguidos pela L-fucose e D-manose (ver tabelas XVI a XXI).

Apesar dos estudos de inibição da atividade lectínica destes moluscos não tenham sido investigadas em outros sistemas (bactérias ou protozoários), parece que a capacidade

destas lectinas de apresentarem sítios de ligação para diferentes açúcares seja uma característica própria das lectinas de moluscos. Semelhante resultado foi obtido pelos testes de inibição da hemoaglutinina de *Helix pomatia* os quais demonstram que esta lectina é inibida não só por N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glucosamina, como também por melibiose e rafinose⁴⁰.

Embora os dados atuais sugere uma multiplicidade de sítios de ligação para carboidratos nestas lectinas, como indicado pelo estudo de inibidores da reação de hemoaglutinação, experiências feitas com sistema contendo em adição soro anti-A e anti-B e inibidores, quer de lectina quer do soro demonstraram que estes sítios na lectina são distintos daqueles que se encontram nos antígenos A e B. Exemplificando, o soro anti-A e a lectina de *B. straminea* se ligam a sítios diferentes, localizados na superfície de hemácia A, como a consequente hemoaglutinação.

Uma multiplicidade de sítios de ligação para carboidratos em lectinas, foi também sugerido por ISHIYAMA et al.⁴⁰ como sendo uma característica comum das aglutininas de moluscos.

A capacidade de ligar-se a múltiplos açúcares talvez esteja associada ao grande espectro de atividade biológica das lectinas destes moluscos.

Sendo as massas de ovos de moluscos depositadas em lugares os mais adversos, necessitam de defesas contra agentes patogênicos potenciais e muito provavelmente este mecanismo de defesa inicia-se pela ligação destas lectinas aos açúca

res expostos na superfície destes agentes.

UHLENBRUK et al.⁸⁴ sugerem que a glândula de albúmen de *Helix pomatia* fornece às massas de ovas substâncias protetivas como aglutininas e inibidores de protease.

Corroborando com o ponto de vista exposto, PAULEY⁵⁸, sugere que as aglutinas de certos invertebrados desempenham um papel importante, nos mecanismos de defesa destes animais contra agentes patogênicos.

Um outro dado bastante elucidativo neste particular é fornecido pela lectina de ovas de salmão (purificada por cromatografia de afinidade em gel de agarose) a qual inibe o crescimento de quatro bactérias patogênicas para esta espécie⁸¹.

Resumindo, podemos ressaltar que as lectinas de moluscos (*H. pomatia*) embora tenha sido assinalada em 1899 por CAMUS¹², logo após a descoberta de lectinas, em *Ricinus communis*^{15,73} somente nos últimos anos foi que seu estudo despertou o interesse dos investigadores. No estágio atual de desenvolvimento sobre as investigações de lectina, muitos progressos foram obtidos, permanecendo ainda um desafio o esclarecimento da função biológica das lectinas tanto do reino animal como vegetal.

CONCLUSÕES

- 1 - As lectinas de massas de ovas de *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentam a mesma especificidade hemaglutinante daquelas assinaladas nas respectivas glândulas de albúmen.
- 2 - As lectinas de massas de ovas e glândulas de albúmen dos moluscos estudados são fortemente estimuladas por iões Mg^{++} .
- 3 - Os carboidratos inibidores destas lectinas são inespecíficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDESTINEIN, I.J. Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean (Canavalia ensiformis). Biochim. Biophys. Acta, 133:376-97, 1967.
2. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. Biochem. J., 96: 23C-25C, 1965.
3. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. Biochem. Biophys. Acta, 147: 262-71, 1967.
4. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. VII. Physical and chemical studies on concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. Arch. Biophys. Biochem. 124:218-29, 1968.
5. AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin A-polysaccharide interaction. Can. J. Bioch., 46: 1147-50, 1968.
6. ALLEN, N.K. & BRILLIANTINE, L. A survey of hemagglutinins in various seeds. J. Immunol., 102: 1295, 1969.
7. BIRD, G.W.G. Hemagglutinin in seeds. Vox Sang. 4: 307-13, 1959.
8. BOYD, W.C. & BROWN, R. A specific agglutinin on the snail Otala (Helix) lactea. Nature, 208:593-4, 1965.

9. BOYD, W.C. & REQUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cell in various plants. J. Immunol. 62: 333-9, 1949.
10. BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science, 119: 419, 1954.
11. BURGER, M.M. & NOONAN, K.D. Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumour cell surface. Nature, 228: 512-15, 1970.
12. CAMUS, L. Recherches expérimentales sur une agglutinine produite par la glande de l'albumen chez l' Helix pomatia. C.R. Acad. Sci. (Paris), 129: 233-4, 1899.
13. CIFONELLI, J.A.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. The reaction between concanavalin A and glycogen. J. Am. Chem. Soc., 78:2485-8, 1956.
14. DE WAARD, A.; HICHMAN, S.; KORNFELD, S. Isolation and properties of β -galactoside binding lectins of calf heart and lung. J. Biol. Chem. 251: 7581-7, 1976.
15. DIXSON Australian med. Gaz. 156, 1887. In FRIDBERGER, E. & BROSSA, G.A. Ueber die Eirkungen von Pilxextrakten. Wirkung der Extrakte von Champignon (Agaricus campestris), Steinpilz (Boletus edulis) und Pfefferling (Cantarellus cibarius) auf rote Blutkörperchen, Z. Immun. Forsch. 15: 506-18, 1912.
16. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K., REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-6, 1956.

17. ENTLICHER, G.; KOSTIR; J.V.; KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins. III. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (Pisum sativum L.). Biochem. Biophys. Acta 221: 272-81, 1970.
18. ESTOLA, E. & VARTIA, K.O. Phyttagglutinins in lichens. Ann. Med. exp. Biol. Fenn. Suppl. 33: 392-95, 1955.
19. ETZLER, M.E. & KABAT, E.A. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood A specificity from Dolichos biflorus. Biochemistry, 9: 869-77, 1970.
20. FORD, W.W. Distribution of hemolysins, agglutinin and poisons in fungi, especially the amanitas, the entomolonas, the lactirius and the inocykes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2: 285-318, 1910-11.
21. FUJITA, Y.; IOISHI, K.; SUZUKI, K.; IAMARORI, K.I. Purification and properties of an anti-B hemagglutinin produced by Streptomyces sp. Biochemistry, 14: 4465-70, 1975.
22. GABRIEL, O. Analytical disc gel electrophoresis. In: JAKOBY, W.B. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic. 1970, v.22, p.565-78.
23. GALBRAITH, W. & GOLDSTEIN, I.J. Phytohemagglutinin of the lima bean (Phaseolus lunatus). Isolation, characterization, and interaction with type A blood-group substance. Biochemistry, 11:3976-84, 1972.
24. GILBERTSON, D.E. & ETGES, F.J. Haemagglutinins in the haemolymph of planorbid snails. Ann. Prop. Med. Parasitol., 61: 144-7, 1967.

25. GILBOA-GARBER, N. Purification and properties of hemagglutinin from Pseudomonas aeruginosa and its reaction with human blood cells. Biochim. Biophys. Acta, 273: 165-73, 1972.
26. GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Advan. Carbohydr. Chem. 35: 127-40, 1978.
27. GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E.; MERRICK, J.M. Protein interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta, 97: 68-76, 1965.
28. GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E.; SMITH, E.E. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. Biochemistry, 4: 876-83, 1965.
29. GOLDSTEIN, I.J. & SO L.L. Protein-carbohydrate interaction. III. Agar gel diffusion studies on the interaction of concanavalin A, a lectin isolated from jack bean, with polysaccharides. Arch. Biochem. Biophys. 111: 407-14, 1965.
30. HAMMARSTRÖM, S. Structure, specificity, binding properties, and some biological activities of a blood group A reactive hemagglutinin from the snail Helix pomatia. Ann. N.Y. Acad. Sci. 234: 183-97, 1974.
31. HAMMARSTRÖM, S. Snail (Helix pomatia) hemagglutinin. In: GINSBURG, V. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic. 1972. v.28, p.368-83.
32. HAMMARSTRÖM, S. & KABAT, E.A. Purification and characterization of a blood A reactive hemagglutinin from the snail Helix pomatia and a study of its combining site. Biochemistry, 8: 2696-705, 1969.

33. HAMMARSTRÖM, S.; LINDBERG, A.A.; ROBERTSON, E.S. Precipitation of lipopolysaccharides from rough mutants of *Salmonella typhimurium* by an A-hemagglutinin from *Helix pomatia*. Eur. J. Biochem. 25: 274-82, 1972.
34. HAYES, E.C. & GOLDSTEIN, I.J. An α -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. J. Biol. Chem., 249: 1904-14, 1974.
35. HEHRE, E.J. The origin of specificity: A formulation of the problem for dextrans at the enzymic level. Bull. Soc. Chim. Biol. 42: 1805-8, 1960.
36. HOWE, M.L. & BARRETT, J.T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. Biochim. Biophys. Acta., 215: 97-104, 1970.
37. HUET, C.; LONCHAMPT, M.; HUET, M.; BERNADAC, A. Temperature effects on the concanavalin A molecule and on concanavalin A binding. Biochim. Biophys. Acta, 365: 28-39, 1974.
38. HUDGIN, R.L.; PRICER, W.E.; ASHWELL, G. Jr.; STOCKERT, R.J.; MORREL, G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. J. Biol. Chem. 249: 5536-43, 1974.
39. ISHIYAMA, I. & YAMAGUCHI, T. Anti A agglutinin in albumin gland of adult garden snail. Jpn. J. Leg. Med. 20: 285-8, 1966.
40. ISHIYAMA, I. & TAKATSU, A. Hemagglutinins and enzyme inhibitions, comparative studies on the reactivity of anti A agglutinin of *Helix pomatia* and *Euhadria callizona amalie*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 234: 75-94, 1974.

41. KARLSTROM, B. Evidence of the requirement of a full complement of manganese and calcium ions for optimal binding of carbohydrates to electrophoretically homogeneous concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta. 329:294-304, 1973.
42. KALB, A.J. & LEVITZKI, A. Metal binding sites of concanavalin A and their role in the binding of α -methyl-D-glucopyranoside. Biochem. J. 109: 669-72, 1968.
43. KHALAP, S.; THOMPSON, T.E.; GOLD, E.R. Haemagglutination and haemagglutination-inhibition reactions of extract from snails and sponges. I. Agglutination of human and various animal red cells: its inhibition by sugars and amino sugars. Vox Sang. 18: 501-26, 1970.
44. KHALAP, S.; THOMPSON, T.E.; GOLD, E.R. Haemagglutination and haemagglutination-inhibition reactions of extracts from snails and sponges. II. Haemagglutination-inhibition tests with biological materials and some substances contained in them, Vox Sang. 20: 150-73, 1971.
45. KOCOUREK, J.; JAMIESON, G.A.; VOTRUBA, T.; HOREJSI, V. Studies on phytohemagglutinins. Some properties of the lectins of horse gram seeds (Dolichos biflorus sp.). Biochim. Biophys. Acta. 500: 344-60, 1977.
46. KUNITZ, M. Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from Baker's yeast. J. Gen. Physiol. 35: 423-50, 1952.
47. LIS, H. & SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Am. Rev. Bioch. 42: 541-74, 1973.

48. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-75, 1951.
49. LLOYD, K.O.; KABAT, E.A.; BEYCHOK, S. Immunochemical studies on blood groups. XLIII. The interaction of blood group substances from various sources with a plant lectin, concanavalin A. J. Immunol. 102: 1354-62, 1969.
50. MAJERUS, P.W. & BRODIE, G.N. The binding of phytohemagglutinins to human platelet plasma membranes. J. Biol. Chem. 247: 4253-7, 1972.
51. MÄKELÄ, O. Studies in hemagglutinins of leguminosa seeds. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. Suppl. 35: 1-133, 1957.
52. MARCHALONIS, J.J. & ELDELMAN, J.M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from Limulus polyphemus. J. Mol. Biol. 32: 453-65, 1968.
53. MARKOWITZ, H. Immunosuppressive activity of concanavalin A. J. Immunol. 103: 308-18, 1969.
54. MELLO, M.T. & PARAENSE, W.L. Geographical differences in lectins activity of albumen gland extracts of the planorbid snails B. glabrata and B. tenagophila. Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo 20: 115-20, 1978.
55. NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20: 462-66, 1960.
56. OLSON, M.O.J. & LINER, I.E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. Biochemistry 6: 105-11, 1967.

57. PARDOE, C.J.I. & UHLENBRUK, U. Characteristics of antigenic determinants of intact cell surfaces. J. Med. Lab. Technol. 27: 249-63, 1970.
58. PAULEY, G.B. Physicochemical properties of the natural agglutinins of some mollusks and crustaceans. III. Characterization of invertebrate and plant agglutinins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 234: 145-60, 1974.
59. PORETZ, R.D.; RISS, H.; TIMBERLAKE, J.W.; CHIEN, S. Purification and properties of the hemagglutinin from Sophora japonica seeds. Biochemistry, 13: 250-6, 1974.
60. PROKOP, O.; RACKWITZ, A.; SCHLESINGER, D. A "new" human blood group receptor Ahel tested with saline extracts from Helix hortensis (garden snail) S. African. J. Forensic. Med. 12: 108-10, 1965.
61. PROKOP, O.; SCHLESINGER, D.; RACKWITZ, A. Über eine thermostable "antibody like substance (Anti.Ahel) bei Helix pomatia und deren Herkunft. Z. Immun. Forsch. 129: 402-12, 1965.
62. PROKOP, O.; UHLENBRUCK, G.; KÖHLER, W. A new source of antibody-like substances having anti-blood group specificity. Vox Sang. 14: 321-3, 1968.
63. RACKWITZ, A.; SCHLESINGER, D.; PROKOP, O. Über ein Blutgruppenprinzip B (Anti-A) bei Helix hortensis. Ein neuer menschlicher A-Rezeptor Ahel. Acta Biol. Med. Ger. 15: 187-90, 1965.
64. RENKONEN, E.O. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 26: 66-72, 1948.
In GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. The lactins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. 35: 127-340, 1978.

65. RIGAS, D.A. & JOHNSON, E.A. Studies on the phytohemagglutinin on Phaseolus vulgaris and the mitogenicity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 800-18, 1964.
66. RIGAS, D.A. & HEAD, C. The dissociation of phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris by 8,0M urea and the separation of the mitogenic from the erythroagglutinating activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34: 633-9, 1969.
67. RIONDAN, J.R.; SLAVIK, M.; KARTNER, N. Nature of the lectin-induced activation of plasma membrane Mg^{++} ATPase. J. Biol. Chem. 252: 5449-55, 1977.
68. ROCHE, A.C. & MONSIGNY, M. Purification and properties of Limulin: a lectin (agglutinin) from hemolymph of Limulus polyphemus. Biochim. Biophys. Acta 371: 242-54, 1974.
69. SAGE, H.J. & CONNETT, S.L. Studies on a hemagglutinin from the meadow mushroom. II. Purification, composition, and structure of Agaricus campestris hemagglutinin. J. Biol. Chem., 244: 4713-19, 1969.
70. SAMPAIO, J.C.F.; DMYTRACZENKO, A.; DUARTE, J.H. Studies on lectins from the snails Biomphalaria glabrata and Biomphalaria tenagophila. Intern. Res. Commun. Syst. 1:2-3-5, 1973.
71. SHOHAM, M.; KALB, A.J.; PECHT, I. Specificity of metal ion interaction with concanavalin A. Biochemistry, 12:1914-17, 1973.
72. SO, L.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. XX. On the number of combining sites on concanavalin A, the phytohemagglutini of the jack bean. Biochim. Biophys. Acta. 165:398-404, 1968.

73. STILLMARK, H. Versuche über ricin, Arb. pharmak. Inst. Dorpat. 28: 88-9. 1889.
74. STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mamalian hepatic lectin. Science, 186: 365-66, 1974.
75. SUMNER, J.B. The globulins of the jack bean, Canavalia ensiformis. J. Biol. Chem., 37: 137-42, 1919.
76. SUMNER, J.B. & HOWELL, S.J. The role of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin. J. Biol. Chem. 115: 583-88, 1936.
77. SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol. 32: 227-37, 1936.
78. TEICHBERG, U.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; RESHEFF, G. β -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of Electrophorus electricus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1383-7, 1975.
79. TEMBERTON, R.T. Anti-A and Anti-B of Gastropod. Ann. N.Y. Acad. Sci. 234:95-125, 1974.
80. TUNIS, M. The inhibitory action of EDTA on erythrocyte agglutination by lectins. J. Immunol. 95: 876-9, 1965.
81. VOSS, E.W.; FRYER, J.L. Jr.; BANOWETZ, M. Isolation, purification and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. Arch. Biochem. Biophys. 186: 25-34. 1978.

82. UCHIDA, T. & MATSUMOTO, T. Heterogeneity of commercially available concanavalin A with respect to carbohydrate-binding ability. Biochim. Biophys. Acta. 257:230-4, 1972.
83. UHLENBRUK, G. & PROKOP, D. An agglutinin from Helix pomatia, which reacts with terminal N-acetyl-D-glucosamine. Vox. Sang. 11: 519-20, 1966.
84. UHLENBRUCK, G.; SPRENGER, I.; ISHIYAMA, I. "Über die Funktion der Eiweissdrüse von Helix pomatia. Experientia, 28: 242-3, 1972.
85. UNO, Y. & HOSHI, M. Separation of the sperm agglutinin and the acrossome reaction-inducing substance in egg jelly of starfish. Science, 200: 58-9, 1978.
86. WUAWE, J.P.V.; LOONTIENS, F.G.; De BROYNEM C.K. The interaction of Ricinus comunis hemagglutinin with polysaccharides and low molecular weight carbohydrates. Biochim. Biophys. Acta, 313: 99-105, 1973.
87. WRIGLEY, C.M. Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel eletrofocusing. J. Cromatogr. 36: 362-5, 1968.
88. YARIV, J.; KALB, A.J.; LEVITZKI, A. The interaction of concanavalin A with methyl α -D-glucopyranoside. Biochim. Biophys. Acta, 165: 303-5, 1968.